

## EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究

所属 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 食品機能研究部  
研究者 斎藤衛郎

### 分担研究者

- (1) 独立行政法人 国立健康・栄養研究所食品機能研究部 永田純一
- (2) 日清オイリオ株式会社 研究所 笠井通雄

### 要旨

脂質代謝・体脂肪蓄積抑制に効果的に働く EPA、DHA 含有新規構造油脂の開発および有効性評価を行なうため、純度約 70～80%の構造油脂を合成し、ラットに与え有効性を調べた。その結果、構造油脂の摂取は顕著な脂質低下作用と体脂肪蓄積抑制をもたらした。

### 1. 研究目的

肥満は、生活習慣病である心疾患・高血圧・糖尿病の誘発因子となり、生活習慣病の中でも鍵となる疾病である。従って、その予防および改善は、QOLの向上のために非常に重要である。肥満の形成は、日常の食習慣に大きく影響を受けるため、食事内容、特に摂取される脂質の質と量あるいは摂取バランスの不適切さが主要な病因となりうるこれがこれまでの研究で明らかになっている。

本研究の主な目的は、その生理機能として肥満予防および改善効果を有する高度不飽和脂肪酸の効率的な供給と構造特異性を生かした体脂肪蓄積抑制に優れた新規油脂の開発およびその生理的有効性の評価である。これまで肥満と食用油脂の関連性に関する多くの報告がなされているが、効率的な吸収と代謝特性に優れた油脂は、必ずしも見いだされていない。そこで今回エステル交換技術を用いて位置特異性と吸収代謝特性を考慮した新規構造油脂をデザインし、体脂肪蓄積および肥満に対し抑制的に働く構造油脂の創出を試みた。これらの油脂は、生活習慣病のリスクファクターとなりうる脂質をその構成脂肪酸の生理的特性を生かして効率よく利用することにより肥満の抑制を介して生活習慣病の改善をもたらすことが期待される。本研究は、人への適用を前提に、その有効性と安全性を確認するための基礎データを得ることを目的とする。

H13年度は、肥満・体脂肪蓄積に対し予防および改善効果を有する新規構造油脂合成を行なうためのスクリーニングとして、n-3系脂肪酸(α-リノレン酸(α-LN)、エイコサペンタエン酸(EPA)およびドコサヘキサエン酸(DHA))に焦点を当て、これら脂肪酸の抗肥満作用あるいは体脂肪蓄積抑制効果と血清脂質レベルに及ぼす影響を調べた。実験はn-6系脂肪酸(リノール酸(LA))を対照にin vivoおよび脂肪前駆細胞培養を用いたin vitroにおける各脂肪酸の影響の評価検討を行い、構造油脂合成に用いる脂肪酸の有効性を評価し、新規構造油脂のデザインおよび合成を試みた。

今年度は、前年度のスクリーニング結果と中鎖脂肪酸の代謝特性を利用して新規に合成された4種類の構造油脂を用いて、各構造油脂の生物学的有効性と安全性を明らかにするため、従来の食用油(大豆油)を対照とし、実験動物に自由摂取させ成長、脂質代謝、体脂肪蓄積および安全性に及ぼす影響の比較検討を行う。また、脂肪酸結合部位と脂肪組織脂肪酸組成の関連性を調べた。さらに実験に用いた構造油脂の酸化安定性に関する検討を行い、食用油としての利用性に関する情報を収集した。

## 2. 研究方法

H13年度は主に構造油脂の設計を行うためのスクリーニングを *in vivo* あるいは *in vitro* において行った。 *In vivo* の実験は、4週令の雄SD系ラットに $\alpha$ -リノレン酸 ( $\alpha$ -LN)、エイコサペンタエン酸 (EPA) およびドコサヘキサエン酸 (DHA) をエネルギー比約8%レベルで含むAIN-76に基づいて作成された飼料を約1ヶ月間自由摂食させ、体脂肪蓄積および摂取した脂肪酸の影響を調べた。実験期間終了後は、一夜絶食を行い、心採血によって犠死せしめ、分析に必要な血液、肝臓および副腎周辺脂肪組織を採取した。血清総コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質濃度を市販酵素試薬にて測定を行った。また抽出した各臓器の脂質画分をクロロホルム-メタノール混液により抽出を行い、それぞれの臓器に取り込まれる脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにて分析した。

*In vitro* の実験は、8週齢の雄Wistar系ラット副腎脂肪組織より調製した脂肪前駆細胞を用いて脂肪蓄積に及ぼす各脂肪酸の影響を調べた。採取した脂肪組織はコラゲナーゼを含む Krebs-Ringer 液で処理し、脂肪前駆細胞を調製した。前駆細胞はアスコルビン酸を含む DMEM 培地で培養し、その後 100  $\mu$ M の各脂肪酸および成長因子を含む培地で48時間インキュベーションした。さらに1週間インスリンを含む DMEM 培地で培養を行った。細胞内 TG 濃度は、細胞を破砕し、市販酵素試薬を用いて測定した。蓄積された脂質は Folch らの方法により抽出し脂肪酸組成を GLC により分析した。また、培地中のアディポサイトカイン (レプチン、IL-6 および TNF- $\alpha$ ) 量は市販 ELISA kit を用いて測定した。

*In vivo* および *in vitro* のスクリーニング結果から n-3 系脂肪酸として EPA および DHA を選択した。新規構造油脂は、EPA および DHA を 1,3-位特異的リパーゼによってトリカプリルグリセリドに対して酵素転換を行い、中鎖脂肪酸と EPA および DHA をトリグリセリド構造内に含む新規構造油脂の合成を試みた。合成目標油脂は、① DHA-C8-C8、② C8-DHA-C8、③ EPA-C8-C8 および④ C8-EPA-C8 の4種類とした。酵素転換後、未反応の脂肪酸およびトリカプリルトリグリセリドを除去し、溶剤を分別後、留去およびろ過を行い目的の構造油脂の回収を行なった。

本年度は、昨年度合成された各構造油脂の生物学的有効性と安全性を調べるため、従来の食用油を対照とし、実験動物に28日間自由に摂取させ脂質代謝、体脂肪蓄積および安全性に関して比較検討を行った。実験は4週令の雄Wistar系ラットにC8-EPA-C8、EPA-C8-C8、C8-DHA-C8、DHA-C8-C8をエネルギー比約15%レベルで含むAIN-93Gに基づいて作成された飼料を28日間自由摂食させた。実験期間終了後は、一夜絶食後、腹部大動脈より採血を行い、分析に必要な血液、肝臓および副腎周辺あるいは腎周囲腹背側脂肪組織を採取した。血清および肝臓脂質濃度、体脂肪蓄積および摂取した脂肪酸の影響を調べた。血清総コレステロール、HDL-コレステロール、トリグリセリドおよびリン脂質濃度を市販酵素試薬にて測定を行った。また抽出した各臓器の脂質画分をクロロホルム-メタノール混液により抽出を行い、それぞれの臓器に含まれる脂質濃度は従来の方法に準じ、また脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにて分析した。加えて、各構造脂質の酸化安定性に関する検討を行った。酸化安定性は、過酸化価 (POV) の測定と CDM 試験を大豆油あるいは魚油の各測定値と比較検討した。

## 3. 研究成果

H13年度に行った *in vivo* の実験では、体重増加量に食餌の影響は認められなかった。肝臓重量はDHA摂取群で、副腎脂肪組織および腎周囲の脂肪組織重量はEPA、DHA および $\alpha$ -LN、EPA、DHAの等量混合群で有意に低い値 ( $p < 0.05$ ) を示した。血清脂質濃度は、LA> $\alpha$ -LN>EPA $\geq$ 等量混合>DHAの順に低下する傾向が確認され、EPA、等量混合およびDHA群は他の群と比較して有意な低下を示すものもあった。また、血清、肝臓、副腎および腎周囲脂肪組織の脂肪酸組成は食餌に含まれる脂肪酸組成を反映したものであった。

また *In vitro* における研究では、細胞内への経時的な TG の蓄積は、 $\alpha$ -LN 群が顕著な蓄積傾向を示した。一方、DHA 群ではほとんど細胞内蓄積を示さなかった。n-3 系脂肪酸では  $\alpha$ -LN > EPA > DHA の順で TG 蓄積量が低下した。培地中へのレプチン産生量は LA >  $\alpha$ -LN > EPA > DHA の順で低下した。n-3 系脂肪酸群はいずれも低値を示したが、有意な差を認めなかった。IL-6 産生量はレプチンと同様の傾向を示したが、EPA および DHA 群で有意に低い値を示した。

新規構造油脂の合成は、これまでに① DHA-C8-C8 および③ EPA-C8-C8 の構造油脂 2 種類の合成を完了した。① DHA-C8-DHA タイプの構造油脂合成は、エステル交換反応により約 70% 合成された。またこれらの構造油脂の 2 位には約 90% の C8 が位置するトリグリセリドであることが確認されたが、DHA-C8-C8 タイプも約 12% 含まれていた。③ EPA-C8-C8 の構造油脂も①タイプと同様約 70% の合成率であった。この構造油脂の 2 位には約 97% の C8 が位置するト

リグリセリドであることが確認されたが、EPA-C8-EPA タイプの構造油脂の比率が 23% を占めた。

本年度、構造油脂を用いて行った動物実験の結果、各構造油脂の摂取は成長、食餌効率および各臓器重量に顕著な影響を及ぼさなかったが、C8-EPA-C8 および C8-DHA-C8 を摂取した動物の体重変化は他の群と比較して低い増加傾向を示した。EPA-C8-C8 および DHA-C8-C8 摂取群は大豆油とほぼ同等の成長であった。体脂肪の蓄積に関して副睾丸脂肪組織における重量変化は認められなかったが、腎周囲腹背側脂肪組織重量は、DHA 含有構造油脂 (C8-DHA-C8 および DHA-C8-C8) において有意な低下を示した。血清コレステロール濃度は、構造油脂摂取直後より大豆油と比較して有意な低下を示した。特に、C8-EPA-C8 および C8-DHA-C8 を摂取した動物の血清コレステロール値は低い値で最終日まで推移した。血清 TG 濃度に対して、EPA を含む構造油脂 (C8-EPA-C8 および EPA-C8-C8) の摂取は他の群と比較して有意な低下を示した。肝臓コレステロール濃度は構造脂質摂取による有意な低下を認めなかったが、EPA を含む構造脂質の摂取による TG 濃度の有意な低下を観察した。構造脂質摂取による組織脂肪酸組成への影響は各構造油脂の脂肪酸組成を反映した。すなわち、副睾丸脂肪組織の脂肪酸組成において大豆油摂取群はオレイン酸およびリノール酸を多く含み、EPA-C8-C8 および C8-EPA-C8 摂取群は EPA および C22:5 の割合が増加した。また、DHA-C8-C8 および C8-DHA-C8 摂取群は DHA 割合の増加を認めた。C8 は EPA-C8-C8 および C8-EPA-C8 摂取群で DHA-C8-C8 および C8-DHA-C8 摂取群と比較してより高い蓄積を示した。腎周囲腹背側脂肪組織も同様に、食事脂肪酸組成を反映し、EPA-C8-C8 および C8-EPA-C8 摂取群は EPA および C22:5 の割合が増加した。また、DHA-C8-C8 および C8-DHA-C8 摂取群は DHA 割合の増加を認めた。C8 は各構造油脂間における蓄積に差を認めなかった。肝臓脂質過酸化度は、大豆油 < EPA-C8-C8 < C8-EPA-C8 < DHA-C8-C8 < C8-DHA-C8 の順に高くなった。C8-DHA-C8 の脂質過酸化度は大豆油の約 1.4 倍であった。油脂の酸化安定性に関して脂肪酸の結合部位による酸化安定性に相違を観察された。すなわち DHA、EPA とともに、AV、POV の数値はグリセリド骨格の 2 位に EPA および DHA が結合する構造油脂の方が 1 位に結合する油脂より低かった。CDM 試験においても、同様の傾向が確認された。病理組織学的検討は現在検討中である。

#### 4. 考察・まとめ

H13 年度に行った *in vivo* の実験結果より、各 n-3 系脂肪酸の相対的な生理活性の比較および評価から EPA および DHA 前駆体としての  $\alpha$ -LN の供給は、脂質代謝改善および脂肪蓄積抑制に関して効果が弱いこと、また鎖長の伸長に伴いより効果的に脂質代謝の改善と脂肪蓄積抑制に作用することが明らかとなった。従って体脂肪蓄積抑制的に作用させるには  $\alpha$ -LN を有する構造より EPA あるいは DHA を任意の位置に配した構造がより効果的な生理作用を発揮すると予測される。*in vitro* における実験からも各 n-3 系脂肪酸の添加に伴う細胞内脂肪蓄積とアディポサイトカインの産生を観察したが、細胞内脂質蓄積には DHA が抑制的に作用することを観察した。また、アディポサイトカインの産生にも EPA および DHA は効果的に作用し、抗肥満に強く作用する可能性が示唆された。

これらの実験結果から、脂質代謝改善および脂肪蓄積抑制効果が期待される EPA と DHA の 2 種類の脂肪酸と中鎖脂肪酸を組合せた新規構造油脂をデザインした。中鎖脂肪酸は、長鎖脂肪酸と異なる吸収および代謝を受け、ケトン体として抹消組織のエネルギー源として利用されることから、EPA あるいは DHA と競合的に作用するのではなく、異なる作用機序が生体内で成り立つと考えられる。したがって中鎖脂肪酸は、EPA および DHA の効果にネガティブに作用する脂肪酸とは考えにくく、合成面からの利点も多いためこれらの脂肪酸を組合せた構造油脂が合成されることとなった。

H13 年度における脂肪酸スクリーニング実験結果より、グリセロール骨格の 1 あるいは 3 位に EPA あるいは DHA が結合した構造油脂と 2 位に EPA あるいは DHA が結合し、その他の位置に中鎖脂肪酸が占める 4 タイプの構造油脂をデザインし合成を行ない約 70~80% の純度の構造脂質がえられており、H14 年度はこれらの構造油脂を用いて油脂の位置特異的な生理活性に関する研究が行われた。

構造脂質の脂肪酸結合部位による特徴的な生理機能として、体重増加量の抑制と血清コレステロール値の顕著な低下が観察された。一方、脂肪組織に対して、組織重量は DHA を含むいずれの構造油脂も効果的に蓄積を抑制し、食餌油脂脂肪酸組成は、腎周囲及び腹背側脂肪組織の脂肪酸プロフィールに影響を及ぼすことも明らかとなった。このことから体脂肪蓄積に関して脂肪酸の位置特異性による効果よりむしろ油脂に含まれる脂肪酸の影響が大きく反映すると考えられた。また、EPA を含む構造油脂は、血清および肝臓 TG 濃度の低下に効果的に作用した。これらの作用も統計学的に結合部位による差異は認められなかった。これらの結果から、体脂肪蓄積および TG 濃度低下作用は構造油脂の脂肪酸結合特異性による機能ではなく脂肪酸の機能により効果が発揮されたものと考えられた。これらのことから構造油脂

の機能性は、構造特異性および脂肪酸特性の選択により脂肪酸生理機能のより効果的な利用が可能と考える。今後、魚油の生理機能と比較検討を行い、構造油脂の機能性に関する詳細な検討を行うことで、より構造油脂の機能特異性が特徴付けられると考える。しかしその一方で、生体内過酸化度の上昇も観察されることから、これら指標への配慮が必要と考えられる。

H13年度は、新規構造油脂の合成に用いる脂肪酸を *in vitro* の実験系と *in vivo* の実験系を用いてスクリーニングを行い、EPA あるいはDHA が脂肪蓄積に抑制的に作用することを確認した。これら脂肪酸と中鎖脂肪酸を組合せた構造油脂をデザインし合成を行った。これまでに純度 70~80%の① DHA-C8-C8、② C8-DHA-C8、③ EPA-C8-C8 および④ C8-EPA-C8 の4種類の構造油脂を合成した。

H14年度は、これらの構造油脂を用いた位置特異性が脂質代謝や体脂肪蓄積に *in vivo* の実験系においてどのような影響を及ぼすのか検討を行ない、構造油脂の摂取により構造特異性による機能性と脂肪酸による機能性がそれぞれ統計学的に認められた。今後の課題として、長期摂取による生体内過酸化指標の変動、魚油との比較による有効性に関する評価検討、作用メカニズムの解明、高脂肪摂取における効果あるいはその他代謝調節因子に及ぼす影響など様々な効果に関する検討を行いその有効性と実用的な利用に関する情報の収集を行う必要があると考えられる。

#### 5. 研究発表

ラット脂肪前駆細胞における n-3 系脂肪酸の脂肪蓄積およびアディポサイトカイン産生へ及ぼす影響、永田純一、斎藤衛郎、第56回 日本栄養・食糧学会大会: 2002. 7. 21、(札幌)

#### 6. 知的所有権の取得状況

特になし。